

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re patent application of:

Rieping, Mechthild

Art Unit: to be assigned

Appl. No.: to be assigned

Examiner: to be assigned

Filed: herewith

Atty. Dkt.: 7909/81000

For: **Process for the Production of  
L-Amino Acids Using Strains of  
the Enterobacteriaceae Family**

**Submission of Priority Document  
in Accordance with the Requirements of Rule 55**

Commissioner of Patents  
U.S. Patent and Trademark Office  
2011 South Clark Place  
**Customer Window, MS Patent Application**  
Crystal Plaza Two, Lobby, Room 1B03  
Arlington, VA 22202

Sir:

Please accept the enclosed certified copy of priority documents DE 103 14 618.0, filed on April 1, 2003, for which benefit under 35 U.S.C. § 119/365 is being claimed in the above-captioned application. In the event priority to the enclosed foreign application has not been claimed, it is claimed hereby.

Respectfully submitted,

FITCH, EVEN, TABIN & FLANNERY

By *Michael A. Sanzo*  
Michael A. Sanzo  
Reg. No. 36,912  
Attorney for Applicant

Date March 30, 2004  
1801 K Street, N.W., Suite 401L  
Washington, DC 20006-1201  
Phone: (202) 419-7013

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 103 14 618.0

**Anmeldetag:** 01. April 2003

**Anmelder/Inhaber:** Degussa AG, 40474 Düsseldorf/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren  
unter Verwendung von Stämmen der Familie  
Enterobacteriaceae

**IPC:** C 12 P, C 12 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 12. Februar 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Komus", is placed over the typed name "Der Präsident".

Komus

**Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren unter Verwendung von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae**

Diese Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung 5 von Stämmen der Familie Enterobacteriaceae, in denen das galP-Gen überexprimiert wird.

**Stand der Technik**

L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der 10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, dass L-Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen der Enterobacteriaceae, insbesondere Escherichia coli (E. coli) und Serratia marcescens, hergestellt werden. 15 Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie z.B. Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie z.B. die Zuckerkonzentration während der 20 Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform, durch z.B. Ionenaustauschchromatographie, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser 25 Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie z.B. das Threonin-Analogon  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Hydroxyvaleriansäure (AHV) oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und 30 L-Aminosäuren wie z.B. L-Threonin produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Aminosäuren produzierender Stämme der Familie

Enterobacteriaceae eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion untersucht. Zusammenfassende Informationen zur Zell- und Molekularbiologie von

5 Escherichia coli und Salmonella sind in Neidhardt (ed): Escherichia coli and Salmonella, Cellular and Molecular Biology, 2<sup>nd</sup> edition, ASM Press, Washington, D.C., USA, (1995) zu finden.

#### Aufgabe der Erfindung

10 Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Maßnahmen zur verbesserten fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, bereitzustellen.

#### Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur

15 fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin, unter Verwendung von Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, die insbesondere bereits L-Aminosäuren produzieren, und in denen die für das galP-Gen kodierende Nukleotidsequenz überexprimiert wird.

20 Das vom galP-Gen kodierte Genprodukt wird im Stand der Technik unter anderem als „Galaktose-Proton Symporter“ oder „Galaktose-Permease“ bezeichnet.

Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich

25 ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Threonin.

30 Der Begriff „Überexpression“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine

in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene um mindestens eine (1) Kopie erhöht oder einen starken Promotor verwendet und gegebenenfalls diese

5 Massnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000%

10 bezogen auf die Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren durch Fermentation von rekombinanten Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, dadurch

15 gekennzeichnet, dass man

- a) die die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen, in denen man das galP-Gen oder für Galaktose-Permease kodierende Nukleotidsequenzen überexprimiert, in einem Medium kultiviert unter 20 Bedingungen, bei denen die gewünschte L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen angereichert wird, und
- b) die gewünschte L-Aminosäure isoliert, wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen 25 (> 0 bis 100 %) im isolierten Produkt verbleiben oder vollständig entfernt werden.

Die rekombinanten Mikroorganismen, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können L-Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, 30 gegebenenfalls Stärke, gegebenenfalls Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es handelt sich um Vertreter der Familie Enterobacteriaceae, ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und

Serratia. Die Gattungen Escherichia und Serratia werden bevorzugt. Bei der Gattung Escherichia ist insbesondere die Art Escherichia coli und bei der Gattung Serratia insbesondere die Art Serratia marcescens zu nennen.

5 Geeignete, insbesondere L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Escherichia, insbesondere der Art Escherichia coli sind beispielsweise

- Escherichia coli H4581 (EP-A 0 301 572)
- Escherichia coli KY10935 (Technical Research

10 Laboratories 61(11): 1877-1882 (1997))

- Escherichia coli VNIIgenetika MG442 (US-A-4278,765)
- Escherichia coli VNIIgenetika M1 (US-A-4,321,325)
- Escherichia coli VNIIgenetika 472T23 (US-A-5,631,157)
- Escherichia coli BKIIM B-3996 (US-A-5,175,107)

15 - Escherichia coli kat 13 (WO 98/04715)

- Escherichia coli KCCM-10132 (WO 00/09660)

Geeignete L-Threonin produzierende Stämme der Gattung Serratia, insbesondere der Art Serratia marcescens sind beispielsweise

20 - Serratia marcescens HNr21 (Applied and Environmental Microbiology 38(6): 1045-1051 (1979))

- Serratia marcescens TLr156 (Gene 57(2-3): 151-158 (1987))

25 - Serratia marcescens T-2000 (Applied Biochemistry and Biotechnology 37(3): 255-265 (1992))

L-Threonin produzierende Stämme aus der Familie der Enterobacteriaceae besitzen bevorzugt, unter anderen, ein

oder mehrere der genetischen bzw. phänotypischen Merkmale ausgewählt aus der Gruppe: Resistenz gegen  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -Hydroxyvaleriansäure, Resistenz gegen Thialysin, Resistenz gegen Ethionin, Resistenz gegen  $\alpha$ -Methylserin, Resistenz 5 gegen Diaminbernsteinsäure, Resistenz gegen  $\alpha$ -Aminobuttersäure, Resistenz gegen Borrelidin, Resistenz gegen Cyclopentan-Carboxylsäure, Resistenz gegen Rifampicin, Resistenz gegen Valin-Analoga wie beispielsweise Valinhydroxamat, Resistenz gegen 10 Purinanaloga wie beispielsweise 6-Dimethylaminopurin, Bedürftigkeit für L-Methionin, gegebenenfalls partielle und kompensierbare Bedürftigkeit für L-Isoleucin, Bedürftigkeit für meso-Diaminopimelinsäure, Auxotrophie bezüglich Threonin-haltiger Dipeptide, Resistenz gegen L-Threonin, 15 Resistenz gegen Threonin-Raffinat, Resistenz gegen L-Homoserin, Resistenz gegen L-Lysin, Resistenz gegen L-Methionin, Resistenz gegen L-Glutaminsäure, Resistenz gegen L-Aspartat, Resistenz gegen L-Leucin, Resistenz gegen L-Phenylalanin, Resistenz gegen L-Serin, Resistenz gegen L- 20 Cystein, Resistenz gegen L-Valin, Empfindlichkeit gegenüber Fluoropyruvat, defekte Threonin-Dehydrogenase, gegebenenfalls Fähigkeit zur Saccharose-Verwertung, Überexpression des Threonin-Operons, Überexpression der Homoserin-Dehydrogenase I-Aspartatkinase I bevorzugt der 25 feed back resistenten Form, Überexpression der Homoserinkinase, Überexpression der Threoninsynthase, Überexpression der Aspartatkinase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Überexpression der Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase, Überexpression der 30 Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, gegebenenfalls der feed back resistenten Form, Überexpression der Phosphoenolpyruvat-Synthase, Überexpression der Transhydrogenase, Überexpression des RhtB-Genproduktes, Überexpression des RhtC-Genproduktes, Überexpression des 35 YfiK-Genproduktes, Überexpression einer Pyruvat-Carboxylase, und Abschwächung der Essigsäurebildung.

Es wurde gefunden, dass Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae nach Überexpression des galP-Gens, in verbesserter Weise L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin produzieren.

5 Die Nukleotidsequenzen der Gene von *Escherichia coli* gehören zum Stand der Technik (Siehe nachfolgende Textstellen) und können ebenfalls der von Blattner et al. (Science 277: 1453-1462 (1997)) publizierten Genomsequenz von *Escherichia coli* entnommen werden.

10 Das Protein, für das das galP-Gen kodiert, wird unter anderem durch folgende Angaben beschrieben:

Bezeichnung: Zucker-Transporter, Galaktose-Proton Symporter, Galaktose-Permease

Funktion: als integrales Membranprotein, Symport von 15 2-Deoxy-D-Galactose und einem Proton in die Zelle

Referenz: Macpherson et al.; The Journal of Biological Chemistry 258(7): 4390-4396 (1983)

20 Venter et al.; The Biochemical Journal 363(Pt 2): 243-252 (2002)

Accession No.: AE000377

Die Galaktose-Permease in *Salmonella typhimurium* wird unter anderem in folgenden Referenzen beschrieben:

25 Postma; Journal of Bacteriology 129(2): 630-639 (1977)

Nagelkerke und Postma; Journal of Bacteriology 133(2): 607-613 (1978)

Die Nukleinsäuresequenzen können den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (NCBI) der

30 National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), der Nukleotidsequenz-Datenbank der European Molecular Biologies

Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland bzw. Cambridge, UK) oder der DNA Datenbank von Japan (DDBJ, Mishima, Japan) entnommen werden.

Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen Gene  
5 können erfindungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können Allele der Gene verwendet werden, die sich aus der Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben. Die Verwendung endogener Gene wird bevorzugt.

Unter „endogenen Genen“ oder „endogenen Nukleotidsequenzen“  
10 versteht man die in der Population einer Art vorhandenen Gene oder Allele beziehungsweise Nukleotidsequenzen.

Zur Erzielung einer Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die  
15 Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im  
20 Verlaufe der fermentativen L-Aminosäuren-Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die  
25 Gene oder Genkonstrukte können entweder in extrachromosomal replizierenden Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der  
30 Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Chang und Cohen (Journal of Bacteriology 134: 1141-1156 (1978)), bei Hartley und Gregori (Gene 13: 347-353 (1981)), bei Amann und Brosius (Gene 40: 183-190 (1985)), bei de

Broer et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 21-25 (1983)), bei LaVallie et al. (BIO/TECHNOLOGY 11: 187-193 (1993)), in PCT/US97/13359, bei Llosa et al. (Plasmid 26: 222-224 (1991)), bei Quandt und Klipp (Gene 80: 161-169 (1989)), bei Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191-195 (1998)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

10 In Enterobacteriaceae replizierbare Plasmidvektoren wie z.B. von pACYC184 abgeleitete Kloniervektoren (Bartolomé et al.; Gene 102: 75-78 (1991)), pTrc99A (Amann et al.; Gene 69: 301-315 (1988)) oder pSC101-Derivate (Vocke und Bastia; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80(21): 6557-6561 (1983)) können verwendet werden. In einem erfindungsgemäßen Verfahren kann man einen mit einem Plasmidvektor transformierten Stamm einsetzen, wobei der Plasmidvektor mindestens eine für die Galaktose-Permease kodierende Nukleotidsequenz trägt.

20 Unter dem Begriff Transformation versteht man die Aufnahme einer isolierten Nukleinsäure durch einen Wirt (Mikroorganismus).

Es ist ebenfalls möglich, Mutationen, die die Expression der jeweiligen Gene betreffen, durch Sequenzaustausch

25 (Hamilton et al.; Journal of Bacteriology 171: 4617-4622 (1989)), Konjugation oder Transduktion in verschiedene Stämme zu überführen.

Nähere Erläuterungen zu Begriffen der Genetik und Molekularbiologie findet man in bekannten Lehrbüchern der

30 Genetik und Molekularbiologie wie beispielsweise dem Lehrbuch von Birge (Bacterial and Bacteriophage Genetics, 4<sup>th</sup> ed., Springer Verlag, New York (USA), 2000) oder dem Lehrbuch von Stryer (Biochemistry, 3 rd. ed., Freeman and Company, New York (USA), 1988) oder dem Handbuch von

Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2 nd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (USA), 1989).

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren,

- 5 insbesondere L-Threonin mit Stämmen der Familie Enterobacteriaceae vorteilhaft sein, zusätzlich zur Überexpression des galP-Gens, ein oder mehrere Enzyme des bekannten Threonin-Biosyntheseweges oder Enzyme des anaplerotischen Stoffwechsels oder Enzyme für die
- 10 Produktion von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat oder Enzyme der Glykolyse oder PTS-Enzyme oder Enzyme des Schwefelstoffwechsels zu überexprimieren. Die Verwendung endogener Gene wird im allgemeinen bevorzugt.

So können beispielsweise gleichzeitig eines oder mehrere

- 15 der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon (US-A-4,278,765),

- 20 • das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-Gen von Corynebacterium glutamicum (WO 99/18228),

- das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen (Molecular and General Genetics 231(2): 332-336 (1992)),

- 25 • das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen (Gene 31: 279-283 (1984)),

- die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB (European Journal of Biochemistry 158: 647-653 (1986)),

- 30 • das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB (EP-A-0 994 190),

- das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen (WO 02/06459),
- das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC (EP-A-1 013 765),
- 5 • das für das Threoninexport-Protein kodierende thrE-Gen von Corynebacterium glutamicum (WO 01/92545),
- das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen (Nucleic Acids Research 11: 5257-5266 (1983); Gene 23: 199-209 (1983)),
- 10 • das für das DNA-Bindeprotein HLP-II kodierende hns-Gen (WO 03/004671),
- das für die Phosphoglucomutase kodierende pgm-Gen (WO 03/004598),
- das für die Fructose Biphosphat Aldolase kodierende fba-Gen (WO 03/004664),
- 15 • das für die Phosphohistidin-Protein-Hexose-Phosphotransferase des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende ptsH-Gen des ptsHICrr-Operons (WO 03/004674),
- das für das Enzym I des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende ptsI-Gen des ptsHICrr-Operons (WO 03/004674),
- 20 • das für die Glucose-spezifische IIA Komponente des Phosphotransferase-Systems PTS kodierende crr-Gen des ptsHICrr-Operons (WO 03/004674),
- das für die Glucose-spezifische IIBC Komponente kodierende ptsG-Gen (WO 03/004670),
- 25 • das für den Regulator des Leucin-Regulons kodierende lrp-Gen (WO 03/004665),
- das für den globalen Regulator Csr kodierende csrA-Gen (Journal of Bacteriology 175: 4744-4755 (1993)),

- das für den Regulator des fad-Regulons kodierende fadR-Gen (Nucleic Acids Research 16: 7995-8009 (1988)),
- das für den Regulator des zentralen Intermediärstoffwechsels kodierende iclR-Gen (Journal of Bacteriology 172: 2642-2649 (1990)),
- das für das 10 Kd Chaperon kodierende mopB-Gen (WO 03/004669), das auch unter der Bezeichnung groES bekannt ist,
- das für die kleine Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpC-Gen des ahpCF-Operons (WO 03/004663),
- das für die große Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpF-Gen des ahpCF-Operons (WO 03/004663),
- das für die Cystein-Synthase A kodierende cysK-Gen (WO 03/006666),
- das für den Regulator des cys-Regulons kodierende cysB-Gen (WO 03/006666),
- das für das Flavoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysJ-Gen des cysJIH-Operons (WO 03/006666),
- das für das Hämoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysI-Gen des cysJIH-Operons (WO 03/006666),
- das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende cysH-Gen des cysJIH-Operons (WO 03/006666),
- das für den positiven Regulator PhoB des pho Regulons kodierende phoB-Gen des phoBR-Operons (WO 03/008606),
- das für das Sensorprotein des pho Regulons kodierende phoR-Gen des phoBR-Operons (WO 03/008606),

- das für das Protein E der äusseren Zellmembran kodierende phoE-Gen (WO 03/008608),
- das für die, durch Fructose stimulierte, Pyruvat Kinase I kodierende pykF-Gen (WO 03/008609),
- 5 • das für die 6-Phosphofructokinase II kodierende pfkB-Gen (WO 03/008610),
- das für das periplasmatische Bindeprotein des Maltose-Transports kodierende malE-Gen (WO 03/008605),
- das für die Superoxiddismutase kodierende sodA-Gen (WO 10 03/008613),
- das für ein Membranprotein mit anti-sigmaE-Aktivität kodierende rseA-Gen des rseABC-Operons (WO 03/008612),
- das für einen globalen Regulator des sigmaE-Faktors kodierende rseC-Gen des rseABC-Operons (WO 03/008612),
- 15 • das für die Decarboxylase Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucA-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008614),
- das für die Dihydrolipoyltranssuccinase E2 Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucB-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008614),
- 20 • das für die  $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucC-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008615),
- das für die  $\alpha$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucD-Gen des sucABCD-Operons (WO 03/008615),
- 25 • das für die Adenylat-Kinase kodierende adk-Gen (Nucleic Acids Research 13(19): 7139-7151 (1985)),
- das für ein periplasmatisches Protein mit Chaperonin-artiger Funktion kodierende hdeA-Gen (Journal of Bacteriology 175(23): 7747-7748 (1993)),

- das für ein periplasmatisches Protein mit Chaperonin-  
artiger Funktion kodierende hdeB-Gen (Journal of  
Bacteriology 175(23): 7747-7748 (1993)),
- das für die Isocitrat-Dehydrogenase kodierende icd-Gen  
5 (Journal of Biological Chemistry 262(22): 10422-10425  
(1987)),
- das für das periplasmatische, Galaktose-bindende  
Transportprotein kodierende mglB-Gen (Molecular and  
General Genetics 229(3): 453-459 (1991)),
- 10 • das für die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase kodierende  
lpd-Gen (European Journal of Biochemistry 135(3): 519-  
527 (1983)),
- das für die E1-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-  
Komplexes kodierende aceE-Gen (European Journal of  
15 Biochemistry 133(1): 155-162 (1983)),
- das für die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-  
Komplexes kodierende aceF-Gen (European Journal of  
Biochemistry 133(3): 481-489 (1983)),
- das für die Aminopeptidase B kodierende pepB-Gen  
20 (Journal of Fermentation and Bioengineering 82: 392-397  
(1996))
- das für die Aldehyd-Dehydrogenase (E.C. 1.2.1.3)  
kodierende aldH-Gen (Gene 99(1): 15-23 (1991)),
- das für das Eisen-Speicher-Homoprotein  
25 (Bacterioferritin) kodierende bfr-Gen (Journal of  
Bacteriology 171(7): 3940-3947 (1989))
- das für die Uridin-Phosphorylase kodierende udp-Gen  
(Nucleic Acids Research 17(16): 6741 (1989)) und

- das für den Regulator der SigmaE-Faktor-Aktivität kodierende rseB-Gen (Molecular Microbiology 24(2): 355-371 (1997)),

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

5 Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Überexpression des galP-Gens, eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen (Journal of Bacteriology 169: 4716-4721 (1987)),
- das für die Malat-Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37) kodierende mdh-Gen (Archives in Microbiology 149: 36-42 (1987)),
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa (Accession Number AAC77180 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), WO 02/29080),
- das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP (Accession Number AAC77179 des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD, USA), WO 02/29080),
- das für das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen (WO 02/29080),
- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen (WO 02/36797),
- das für das Enzym Isocitrat-Lyase kodierende aceA-Gen (WO 02/081722),
- das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen (WO 02/081721), das auch unter der Bezeichnung mlc-Gen bekannt ist,

- das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen (WO 02/081698), das auch unter der Bezeichnung cra-Gen bekannt ist,
- das für den Sigma<sup>38</sup>-Faktor kodierende rpoS-Gen (WO 01/05939), das auch unter der Bezeichnung katF-Gen bekannt ist,
- das für die Aspartat Ammonium-Lyase kodierende aspA-Gen (WO 03/008603) und
- das für die Malatsynthase A kodierende aceB-Gen (WO 03/008604)

abzuschwächen, insbesondere auszuschalten oder die Expression zu verringern.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität oder Konzentration eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Enzym (Protein) oder Gen inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

Weiterhin kann es für die Produktion von L-Aminosäuren, insbesondere L-Threonin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Überexpression des galP-Gens, unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing

Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können im 5 batch - Verfahren (Satzkultivierung), im fed batch (Zulaufverfahren) oder im repeated fed batch-Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die 10 Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise 15 den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

20 Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und gegebenenfalls Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und 25 Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige 30 Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und

Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder 5 die entsprechenden Natrium-haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen enthalten, wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine 10 zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert 15 werden.

Die Fermentation wird im allgemeinen bei einem pH-Wert von 5,5 bis 9,0, insbesondere 6,0 bis 8,0, durchgeführt. Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. 20 Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem 25 Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise 30 bei 25°C bis 45°C und vorzugsweise bei 30°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum an L-Aminosäuren bzw. L-Threonin gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Die Analyse von L-Aminosäuren kann durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry 30: 1190-1206 (1958))

5 beschrieben, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry 51: 1167-1174 (1979)) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient bevorzugt zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, wie

10 beispielsweise L-Threonin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-Homoserin und L-Lysin, insbesondere L-Threonin.

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren durch Fermentation von rekombinanten Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, dadurch gekennzeichnet,  
5 dass man
  - a) die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen, in denen man das galP-Gen oder für Galaktose-Permease kodierende Nukleotidsequenzen überexprimiert, in einem Medium kultiviert unter Bedingungen, bei denen die gewünschte L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen angereichert wird, und  
10
  - b) die gewünschte L-Aminosäure isoliert, wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder  
15 Anteilen (> 0 bis 100 %) im isolierten Produkt verbleiben oder vollständig entfernt werden.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man rekombinante Mikroorganismen einsetzt, die man durch die Transformation eines Mikroorganismus der Familie Enterobacteriaceae mit einem Vektor erzeugt,  
20 wobei der Vektor ein galP-Gen enthält.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in den rekombinanten Mikroorganismen die Kopienzahl des Gens um mindestens 1 erhöht vorliegt.  
25
4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung der Kopienzahl des Gens um mindestens 1 durch Integration des Gens in das Chromosom des Mikroorganismus erzielt wird.
5. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Erhöhung der Kopienzahl des Gens um mindestens 1 durch einen extrachromosomal replizierenden Vektor erzielt wird.  
30

6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erzielung der Überexpression
  - a) die Promoter- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle stromaufwärts des galP-Gens mutiert, oder
  - b) Expressionskassetten stromaufwärts des galP-Gens einbaut.
7. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man ein galP-Gen verwendet, dass unter der Kontrolle eines Promoters steht.
8. Verfahren gemäß Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass man durch die Überexpression des galP-Gens die Aktivität oder Konzentration der Galaktose-Permease um mindestens 10 % erhöht, bezogen auf die Aktivität oder Konzentration des Proteins im Empfängerstamm (Ausgangsstamm).
9. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen ausgewählt aus den Gattungen Escherichia, Erwinia, Providencia und Serratia einsetzt.
10. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure überexprimiert.
11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung von L-Threonin Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

- 11.1 das für die Aspartatkinase, die Homoserin-Dehydrogenase, die Homoserinkinase und die Threoninsynthase kodierende thrABC-Operon,
- 11.2 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende pyc-  
5 Gen,
- 11.3 das für die Phosphoenolpyruvat-Synthase kodierende pps-Gen,
- 11.4 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase kodierende ppc-Gen,
- 10 11.5 die für die Transhydrogenase kodierenden Gene pntA und pntB,
- 11.6 das Homoserinresistenz vermittelnde Gen rhtB,
- 11.7 das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende mqo-Gen,
- 15 11.8 das Threoninresistenz vermittelnde Gen rhtC,
- 11.9 das für das Threoninexport-Protein kodierende thrE-Gen,
- 11.10 das für die Glutamat-Dehydrogenase kodierende gdhA-Gen,
- 20 11.11 das für das DNA-Bindeprotein HLP-II kodierende hns-Gen,
- 11.12 das für die Phosphoglucomutase kodierende pgm-  
Gen,
- 11.13 das für die Fructose Biphosphat Aldolase  
25 kodierende fba-Gen,
- 11.14 das für die Phosphohistidin-Protein-Hexose-  
Phosphotransferase kodierende ptsH-Gen,

- 11.15 das für das Enzym I des Phosphotransferase-Systems kodierende ptsI-Gen,
- 11.16 das für die Glucose-spezifische IIA Komponente kodierende crr-Gen,
- 5 11.17 das für die Glucose-spezifische IIBC Komponente kodierende ptsG-Gen,
- 11.18 das für den Regulator des Leucin-Regulons kodierende lrp-Gen,
- 10 11.19 das für den globalen Regulator Csr kodierende csrA-Gen,
- 11.20 das für den Regulator des fad-Regulons kodierende fadR-Gen,
- 11.21 das für den Regulator des zentralen Intermediärstoffwechsels kodierende iclR-Gen,
- 15 11.22 das für das 10 Kd Chaperon kodierende mopB-Gen,
- 11.23 das für die kleine Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpC-Gen,
- 11.24 das für die große Untereinheit der Alkyl Hydroperoxid Reduktase kodierende ahpF-Gen,
- 20 11.25 das für die Cystein-Synthase A kodierende cysK-Gen,
- 11.26 das für den Regulator des cys-Regulons kodierende cysB-Gen,
- 11.27 das für das Flavoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysJ-Gen,
- 25 11.28 das für das Hämoprotein der NADPH-Sulfit-Reduktase kodierende cysI-Gen,

11.29 das für die Adenylylsulfat-Reduktase kodierende cysH-Gen,

11.30 das für den positiven Regulator PhoB des pho Regulons kodierende phoB-Gen,

5 11.31 das für das Sensorprotein des pho Regulons kodierende phoR-Gen,

11.32 das für das Protein E der äusseren Zellmembran kodierende phoE-Gen,

10 11.33 das für die, durch Fructose stimulierte, Pyruvat Kinase I kodierende pykF-Gen,

11.34 das für die 6-Phosphofructokinase II kodierende pfkB-Gen,

11.35 das für das periplasmatische Bindeprotein des Maltose-Transports kodierende malE-Gen,

15 11.36 das für die Superoxiddismutase kodierende sodA-Gen,

11.37 das für ein Membranprotein mit anti-sigmaE-Aktivität kodierende rseA-Gen,

20 11.38 das für einen globalen Regulator des sigmaE-Faktors kodierende rseC-Gen

11.39 das für die Decarboxylase Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucA-Gen,

25 11.40 das für die Dihydrolipoyltranssuccinase E2 Untereinheit der 2-Ketoglutarat Dehydrogenase kodierende sucB-Gen,

11.41 das für die  $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucC-Gen,

11.42 das für die  $\alpha$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase kodierende sucD-Gen,

11.43 das für die Adenylat-Kinase kodierende adk-Gen,

11.44 das für ein periplasmatisches Protein mit Chaperonin-artiger Funktion kodierende hdeA-Gen,

5 11.45 das für ein periplasmatisches Protein mit Chaperonin-artiger Funktion kodierende hdeB-Gen,

11.46 das für die Isocitrat-Dehydrogenase kodierende icd-Gen,

10 11.47 das für das periplasmatische, Galaktose-bindende Transportprotein kodierende mglB-Gen,

11.48 das für die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase kodierende lpd-Gen,

11.49 das für die E1-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceE-Gen,

15 11.50 das für die E2-Komponente des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes kodierende aceF-Gen,

11.51 das für die Aminopeptidase B kodierende pepB-Gen und

20 11.52 das für die Aldehyd-Dehydrogenase kodierende aldh-Gen,

11.53 das für das Eisen-Speicher-Homoprotein kodierende bfr-Gen,

25 11.54 das für die Uridin-Phosphorylase kodierende udp-Gen und

11.55 das für den Regulator der SigmaE-Faktor-Aktivität kodierende rseB-Gen

verstärkt, insbesondere überexprimiert.

12. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Mikroorganismen einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.

13. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Herstellung von L-Threonin Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae fermentiert, in denen man zusätzlich gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe:

13.1 das für die Threonin-Dehydrogenase kodierende tdh-Gen,

15 13.2 das für die Malat-Dehydrogenase kodierende mdh-Gen,

13.3 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) yjfa,

20 13.4 das Genprodukt des offenen Leserahmens (orf) ytfP,

13.5 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende pckA-Gen,

13.6 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende poxB-Gen,

25 13.7 das für die Isocitrat-Lyase kodierende aceA-Gen,

13.8 das für den DgsA-Regulator des Phosphotransferase-Systems kodierende dgsA-Gen,

- 13.9 das für den Fructose-Repressor kodierende fruR-Gen,
- 13.10 das für den Sigma38-Faktor kodierende rpoS-Gen,
- 13.11 das für die Aspartat Ammonium-Lyase kodierende aspA-Gen und
- 13.12 das für die Malatsynthase A kodierende aceB-Gen abschwächt, insbesondere ausschaltet oder die Expression verringert.

5

14. Rekombinante Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, insbesondere der Gattung Escherichia, in denen das galP-Gen oder für die Galaktose-Permease kodierende Nukleotidsequenzen überexprimiert vorliegen.
- 10
15. Mikroorganismen, gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass diese L-Threonin produzieren.
16. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 und 12, dadurch gekennzeichnet, dass man L-Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin herstellt.
- 20
17. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 10 und 12, dadurch gekennzeichnet, dass man L-Aminosäuren, ausgewählt aus der Gruppe L-Isoleucin, L-Valin, L-Methionin, L-Homoserin und L-Lysin herstellt.
- 25
18. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass man L-Threonin herstellt.

**Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren durch Fermentation von rekombinanten Mikroorganismen der Familie Enterobacteriaceae, dadurch 5 gekennzeichnet, dass man

- a) die die gewünschte L-Aminosäure produzierenden Mikroorganismen, in denen man das galP-Gen oder für Galaktose-Permease kodierende Nukleotidsequenzen überexprimiert, in einem Medium kultiviert unter 10 Bedingungen, bei denen die gewünschte L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen angereichert wird, und
- b) die gewünschte L-Aminosäure isoliert, wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder die Biomasse in ihrer Gesamtheit oder Anteilen 15 (> 0 bis 100 %) im isolierten Produkt verbleiben oder vollständig entfernt werden.